

antiarrhythmic effect in anaesthetized dogs. The objective of the present study was to examine, whether this delayed cardioprotective effect of nitrite can be associated with changes in mitochondrial morphology and in calcium content. Three groups of chloralose/urethane anaesthetized dogs were used. Five dogs served as sham-operated controls (SC), whereas in 10-10 dogs myocardial ischaemia was induced by a 25 min occlusion of the anterior descending branch of the left coronary artery (LAD), 24h after the intravenous infusion of either saline (ischaemic control [IC]) or sodium nitrite (NaNO_2 ; 0.2 $\mu\text{mol/kg/min}$; over 20 min). Myocardial tissue samples were taken 2 min after the rapid reperfusion of the LAD, and after preparation, the structural changes (mitochondrial area, perimeter, Feret diameter and roundness), as well as the number of calcium deposits were examined using transmission electronmicroscopy. Compared to the SC group, a 25 min I/R resulted in significant changes in the morphology of the mitochondria; i.e. the mitochondrial area, perimeter and Feret diameter were reduced and the roundness increased. The administration of sodium nitrite significantly attenuated these morphological alterations. I/R also significantly increased both the total and the mitochondrial calcium deposits, which were reduced by the administration of NaNO_2 . We conclude that the infusion of NaNO_2 , 24h before an I/R insult, is able to modify mitochondrial morphology, by preserving the structure of the mitochondria and by reducing calcium overload that resulted from I/R. These effects can certainly be contributed to the delayed antiarrhythmic effect of nitrite.

ANDERSEN-TAWIL-SZINDRÓMA MUTÁCIÓK FUNKCIONÁLIS KARAKTERIZÁLÁSA

Déri Szilvia¹, Hartai Teodóra¹, Jost Norbert¹, Sepp Róbert², Varró András¹, Ördög Balázs¹

¹SZTE ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

²SZTE ÁOK, II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ, Szeged

Kulcsszavak: Andersen–Tawil-szindróma, KCNJ2 mutációk, IK1, Kir2.1 csatorna

Háttér: Az Andersen–Tawil-szindróma (ATS) egy ritka genetikai rendellenesség, amelyben a periodikus paralízis, fejlődési rendellenességek, valamint kamrai aritmiák együttesen fordulnak elő. A betegséget az esetek többségében a KCNJ2 génben bekövetkező funkcióvesztéses mutációk okozzák. A KCNJ2 a Kir2.1 befelé egyenirányító kálium ioncsatorna alegységet kódolja, amely a szívben a repolarizációban és a szívizomsejtek nyugalmi potenciáljának fenntartásában szerepet játszó IK1-csatornának fontos alegysége.

Célok: Tanulmányunkban három ATS-betegből izolált KCNJ2 mutáció, az R218Q, M307I és E293K funkcionális analízist végezzük heterológ expressziós rendszerben. Mindhárom mutáció a Kir2.1 fehérje citoplazmatikus régiójában okoz aminosavcserét. Az R218Q és M307I ismert mutációk, a funkcionális vizsgálatok tekintetében azonban az irodalmi adatok hiányosak. Az E293K mutációt még nem írták le ATS-ben.

Módszerek: A vad típusú (WT) Kir2.1-et kódoló KCNJ2 gén cDNS-ében reprodukáltuk az R218Q, M307I és E293K aminosavcserét okozó mutációkat. A WT és mutáns variánsokat kódoló expressziós vektorokat Chinese Hamster Ovary (CHO) sejtekbe transzfektáltuk. A kifejeződő ioncsatornákat patch clamp technikával karakterizáltuk a transzfekciót követő 36-48. órában.

Eredmények: A WT-Kir2.1-et kifejező sejtekben az IK1-re jellemző feszültség-áram karakterisztikát mutató, Ba^{2+} -szenzitív áramot figyeltünk meg, a -120 mV tesztimpulzus potenciálon mért átlagos áramdenzitás -67 pA/pF ($n=5$) volt. A Kir2.1 mutáns variánsait kifejező sejtekben mért áramdenzitások jelentős mértékben csökkentek a WT-Kir2.1-hez képest. A -120 mV-on mért átlagos áramdenzitás az R218Q variáns esetében -7.6 pA/pF ($n=8$, $p < 0.01$), az M307I esetében -6 pA/pF ($n=11$, $p < 0.001$), az E293K mutáns variáns esetében pedig -9.7 pA/pF ($n=5$, $p < 0.01$) volt. **Következtetés:** Mindezek alapján megállapítható, hogy az R218Q, M307I és az E293K egyaránt funkcióvesztést okoznak a Kir2.1 ioncsatorna működésében a K^+ konduktancia nagymértékű csökkentésével. Eredményeink alátámasztják a vizsgált mutációk kóroki szerepét ATS betegekben.

CHARACTERISATION OF ANDERSEN-TAWIL SYNDROME MUTATIONS

Szilvia Déri¹, Teodóra Hartai¹, Norbert Jost¹, Róbert Sepp², András Varró¹, Balázs Ördög¹

¹1st Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Szeged, Szeged

²Second Department of Internal Medicine and Cardiology Center, University of Szeged

Keywords: Andersen–Tawil syndrome, KCNJ2 mutations, IK1, Kir2.1 channel

Background: Andersen–Tawil syndrome (ATS) is a rare genetic disorder characterized by periodic paralysis, ventricular arrhythmias and dysmorphic features. ATS is caused by loss-of-function mutations in the KCNJ2 gene in the majority of the cases. KCNJ2 encodes for Kir2.1, the main subunit of the IK1 an inwardly-rectifying potassium channel, which plays an important role in the repolarisation and contributes to the maintenance of the resting membrane potential in cardiomyocytes.

Aims: In this study, we carry out the functional characterisation of three mutations R218Q, M307I and E293K, isolated from ATS patients, using a heterologous expression system. All three mutations result in an amino acid substitution in the cytoplasmic domain of Kir2.1. The R218Q and M307I mutations have already been identified in ATS, however, only a limited amount of data is available with respect to their molecular function in the literature. The E293K mutation has not been previously described in ATS.

Methods: The R218Q, M307I and E293K mutations were reproduced in the KCNJ2 gene encoding for the wild type (WT) Kir2.1 subunit. The expression vectors encoding for the WT and mutant Kir2.1 variants were transfected into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The over-expressed ion channels were characterised by the patch clamp technique in 36-48 hours post-transfection.

Results: In the cells expressing the WT-Kir2.1 variant, a Ba^{2+} -sensitive current, showing current-voltage relationship characteristic to IK1 was observed, the mean current density elicited by a -120 mV test pulse was -67 pA/pF ($n=5$). The cells that were transfected with the mutant variants of Kir2.1 presented a significantly lower current densities compared to WT-Kir2.1. The average current densities measured at -120 mV were -7.6 pA/pF ($n=8$, $p < 0.01$) in case of the R218Q, -6 pA/pF ($n=11$, $p < 0.001$) in case of the M307I and -9.7 pA/pF ($n=5$, $p < 0.01$) in case the E293K mutant variant.

Conclusion: Based on this data we conclude the R218Q, M307I and E293K mutations cause loss of function in the Kir2.1 ion channel by greatly decreasing K^+ conductance. These results confirm the causative role of these mutations in the development of ATS.

SZABAD ZSÍRSÁVAK SZEREPE AZ ENDOGÉN ACE-GÁTLÁS KIALAKÍTÁSÁBAN

Fagyas Miklós, Csongrádi Alexandra, Mányiné Siket Ivetta, Papp Zoltán, Tóth Attila

DE ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Debrecen

Kulcsszavak: angiotenzin konvertáló enzim, endogén ACE-gátlás, humán szérumb albumin, szabad zsírsav

Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátlása jelentős támadáspont a kardiovaszkuláris betegségek kezelése szempontjából, ACE-gátló gyógyszerek használatával akár 40%-kal csökkenthető ezen betegségek mortalitása. Az elmúlt években bemutattuk, hogy az ACE jelentős endogén gátlás alatt áll, amelynek hátterében a humán szérumb albumin (HSA) azonosítottuk endogén inhibitoraként. Feltételezésünk szerint az endogén ACE-gátlás kisiklása jelentősen hozzájárulhat a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához és progressziójához.

Jelen tanulmányunk célja a HSA-mediált endogén ACE-gátlást befolyásoló körülmények azonosítása, jellemzése volt.

Vizsgálatainkhoz 68 kardiovaszkuláris betegségben szenvedő beteg mintáját használtuk fel. Rutin laboratóriumi paramétereken túl meghatározásra került az endogén ACE-gátlás mértéke, a szabad zsírsav-koncentráció. Koncentráció hatás-görbék elkészítéséhez rekombináns ACE-t használtunk.

A vizsgálatba bevont betegeknek az endogén ACE-gátlás mértéke jelentős szórást mutatott (62%-83%, $n=68$), amely nem függött össze a minta albumin koncentrációjával ($r_2=0.149$). Feltételezhető, hogy az albumin mellett egyéb faktorok is befolyásolják az endogén ACE-gátlás mértékét. A hidrofób molekulák eltávolítása az albumin felszínéről aktív szeszes kezeléssel jelentősen csökkentette az albumin ACE-gátló képességét (kezelés előtt: $\text{IC}_{50}=5.61$ g/l, $n=3$; kezelés után: $\text{IC}_{50}=31.79$ g/l, $n=3$, $p < 0.001$). Meghatározva a minták szabad zsírsav tartalmát, nem találtunk összefüggést a szabad zsírsav-koncentráció és az endogén ACE-gátlás

között ($r_2=0,089$). Arra a következtetésre jutottunk, hogy a különböző zsírsavak eltérő mértékben módosíthatják az albumin endogén ACE-gátló képességét. Ennek bizonyítására zsírsavmentesített albumint kezeltünk különböző zsírsavakkal, melyek ACE-gátló hatékonyságának mérése folyamatban van.

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a szabad zsírsavak kötődése az albuminhoz elengedhetetlenül szükséges a megfelelő endogén ACE-gátlás kialakításához.

EFFECT OF FREE FATTY ACIDS ON ENDOGENOUS ACE INHIBITION

Miklós Fagyas, Alexandra Csongrádi, Ivetta Mátyiné Siket, Zoltán Papp, Attila Tóth

Division of Clinical Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen

Keywords: angiotensin-converting enzyme, endogenous ACE-inhibition, human serum albumin, free fatty acid

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition reveals a relevant target mechanism in the treatment of cardiovascular diseases (CDs). ACE inhibitors have the potential to reduce cardiovascular mortality up to 40%. In the recent years, we have reported that ACE endures a significantly strong endogenous inhibition, which is attributable to the human serum albumin (HSA), which acts as an endogenous inhibitor of ACE. We suppose that decreased endogenous ACE inhibition may be related to the development and progression of CDs.

Our aim was to identify and characterize factors influencing HSA-mediated endogenous ACE inhibition.

We evaluated samples of 68 patients suffering from CDs. Beside routine laboratory parameters, the extent of endogenous ACE inhibition and free fatty acid concentration were also measured. To evaluate dose-response relationship, recombinant ACE was used.

The extent of endogenous ACE inhibition varied significantly between patients (62-83%, $n=68$), but it had no relationship with the HSA concentration in the samples ($r_2=0,149$). It is therefore presumed that, by albumin, other factors should also influence the extent of endogenous ACE inhibition. Removal of hydrophobic molecules from the surface of albumin by activated charcoal significantly decreased the capacity of albumin to inhibit ACE activity (before treatment: $IC_{50}=5,61$ g/L, $n=3$, after treatment: $IC_{50}=31,79$ g/L, $n=3$, $p<0,001$). Free fatty acid concentrations were measured from the samples and we found no relationship between free fatty acid concentration and the extent of endogenous ACE inhibition ($r_2=0,089$). We concluded that different types of fatty acids may modify the endogenous ACE-inhibiting capacity of albumin to different degrees. To provide evidence of this concept, we treated fatty acid free albumin with different types of fatty acids and measurements of its ACE inhibiting capacity is under progress.

Our results show that free fatty acids binding to albumin are essential for the adequate endogenous ACE inhibition.

KÜLÖNBÖZŐ SZELEKTÍV NCX-GÁTLÓ VEGYÜLETEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA EMLŐSZÍVEKBEN

Jost Norbert László¹, Kohajda Zsófia², Piszár Ildikó¹, Prorok János¹, Szakonyi Zoltán³, Nagy Norbert², Levijoki Jouko⁴, Pollesello Piero⁴, Koskelainen Tuula⁴, Papp Gyula¹, Varró András¹

¹SZTE ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

²MTA-SZTE, Keringésszervek farmakológiai Kutatócsoport, Szeged

³SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet, Szeged

⁴Orion Gyógyszergyár, Espoo, Finnország

Kulcsszavak: szívelektrofiziológia, antiaritmiás szerek, patch-clamp

Bevezetés: Szívizomsejteken a Na/Ca-csereáram (NCX), a Ca^{2+} -homeosztázis egyik fő szabályozó transzportere, ugyanakkor fontos szerepe lehet a Ca^{2+} -kiáramlás alatt fellépő triggerelt aritmiák kialakításában is. Ezért felvetődik annak a gondolata, hogy a szelektív NCX-gátlók hatékony antiaritmiás szerek lehetnének, de sajnos szelektív NCX-gátlók hiányában ennek a hipotézisnek a közvetlen ellenőrzése eddig nem volt lehetséges.

Módszerek: A jelen tanulmányban egy sorozat karbociklusos nukleozid analógokat (GYKB kódjelű vegyületek) terveztünk, szintetizáltunk és, mint lehetséges új NCX-gátlószerekként vizsgáltuk meg őket. A GYKB-vegyületek hatásait összehasonlítottuk két új Orion (ORM kódjelű) NCX-gátló vegyületnek az NCX-áramra kifejtett hatásával. Ezen kívül megvizsgáltuk,

tuk, a GYKB- és ORM-vegyületek szelektivitásának hatásait az L-típusú kalcium (ICaL) és a főbb repolarizáló transzmembrán K^+ -áramokra a patch-clamp technika segítségével izolált nyúl kamrai szívizomsejteken. Hármas „lead” GYKB-vegyület lehetséges antiaritmiás hatását ouabain indukálta tengerimalac aritmia modellben vizsgáltuk meg.

Eredmények: Egy molekulakönyvtár adatainak segítségével legalább 60 karbociklusos nukleozid analóg vegyületet szintetizáltunk. Ezekből három vegyület (GYKB-6635, GYKB-6704, GYKB-6707) a mikromoláris koncentráció tartományban rendelkezett jelentős NCX gátló hatással, míg a két vizsgált ORM (ORM-11372 és ORM-11803) vegyület, pedig szubmikromoláris koncentráció tartományban bizonyult NCX-áram inhibitor tulajdonságúnak. Sem a GYKB-, sem az ORM-vegyületek nem változtatták meg szignifikánsan az ICaL és főbb repolarizáló K^+ -áramok tulajdonságait. A GYKB-vegyületekkel történő előkezelés szignifikánsan késleltette az ouabain indukálta DAD (késői utódépolarizáció) típusú kamrafibrilláció kifejlődését Langendorff perfundált tengerimalacszívekben.

Következtetések: Kísérleteink alapján arra következtethetünk, hogy a vizsgált GYKB- és ORM-vegyületek hatékony és szelektív gátlói az NCX-áramnak, és lehetséges gyógyszerjelöltek a DAD-típusú kamrai aritmiák megelőzése céljából.

THE COMPARISON OF THE EFFECT OF SEVERAL NOVEL SELECTIVE NCX INHIBITOR ANALOGUES IN MAMMALIAN HEARTS

Norbert László Jost¹, Zsófia Kohajda², Ildikó Piszár¹, János Prorok¹, Zoltán Szakonyi³, Norbert Nagy², Jouko Levijoki⁴, Piero Pollesello⁴, Tuula Koskelainen⁴, Gyula Papp¹, András Varró¹

¹1st Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Szeged, Szeged

²MTA-SZTE Research Group of Cardiovascular Pharmacology, Szeged

³Institute of Pharmaceutical Chemistry, Medical School, University of Szeged, Szeged

⁴Orion Pharma, Espoo, Finland

Keywords: cardiac electrophysiology, antiarrhythmic drugs, patch-clamp

Introduction: The sodium-calcium exchanger (NCX) has crucial function in the cardiac intracellular Ca^{2+} homeostasis as well as may have important role in development of triggered arrhythmias during Ca^{2+} overload. Therefore specific blockers of NCX could be potentially antiarrhythmic however the direct analysis was seriously hampered by the lack of selective inhibitors.

Methods: In this study we have designed, synthesized and investigated a series of carbocyclic nucleoside analogues (CNA) as novel selective NCX inhibitors. We compared their effects with ORM-11372 and ORM-11838 on the NCX current. The selectivity of effective CNA analogue (GYKB6635) and ORM compounds were investigated on the L-type calcium current and the selectivity of GYKB6635 was analyzed on the main repolarizing potassium currents by using patch clamp techniques in isolated rabbit ventricular myocytes. The possible antiarrhythmic effects of CNA analogues (GYKB6635, GYKB6704, GYKB6707) were investigated in guinea pig ouabain-induced arrhythmia models.

Results: At least 60 CNA molecules were synthesized based on available molecule libraries. Three compounds (GYKB6635, GYKB6704, GYKB6707) at micromolar concentration, and ORM-11372 and ORM-11803 in submicromolar range exerted strong inhibitory effects on NCX current. The GYKB6635 and ORM compounds did not affect the L-type calcium current. GYKB6635 also did not influence the main repolarizing potassium currents. Pre-treatment with CNA compounds (GYKB6635, GYKB6704, GYKB6707) significantly delayed the development time of ouabain induced DAD related ventricular fibrillation in Langendorff perfused guinea pig hearts.

Conclusion: It is concluded that several CNA analogues and ORM compounds are potent and selective inhibitors of the cardiac NCX current, and could be possible drug candidates to prevent DAD related arrhythmias.

A BAL KAMRAI KONTRAKTILITÁS LOKÁLIS ZAVARAINAK MEGJELENÉSE GLOBÁLIS DIASZTOLÉS DISZFUNKCIÓBAN AZ MREN2 HIPERTENZÍV PATKÁNYBAN

Kovács Árpád¹, Fülöp Gábor¹, Csipő Tamás¹, Bódi Beáta¹, Oláh Attila², Radovits Tamás², Merkely Béla², Papp Zoltán¹, Barta Judit³, Tóth Attila¹